

Regulação da produção da Eritropoietina e novas abordagens terapêuticas no tratamento da anemia da Doença Renal Crónica

Dissertação: Artigo de Revisão Bibliográfica

Autor:

Filipa Maria Tavares Almeida

Mestrado Integrado em Medicina

Orientadora:

Prof. Doutora Idalina Maria Almeida Brandão de Melo Beirão

Professora Auxiliar Convidada do MIM – ICBAS, Regente de Semiologia

Médica e Cirúrgica I e II

Assistente Hospitalar Graduada de Nefrologia

Junho de 2014

RESUMO

Há cerca de 20 anos atrás, o tratamento da anemia da Doença Renal Crónica foi revolucionado pela introdução da eritropoietina (EPO) humana recombinante, aprovada na Europa em 1990. Este eficaz tratamento substituiu as transfusões sanguíneas intermitentes, mas, dada a semivida relativamente curta da molécula, tinha de ser administrado duas a três vezes por semana.

Posteriormente, surgiram mais dois agentes estimuladores da eritropoiese, com uma duração de ação prolongada: em 2001, a darbepoetina alfa e, em 2007, o CERA. Seguiu-se, em 2012, o peginesatide, um péptido sintético, mimético da EPO. Apesar de não possuir homologia estrutural com a EPO, é capaz de ativar o seu recetor e estimular a eritropoiese, e necessita apenas de administração mensal.

Mantém-se a pesquisa de novas estratégias terapêuticas nesta área, algumas encontram-se em fase laboratorial e outras já em ensaios clínicos fase II-III. Além da frequência de administração procuram-se outras vias de administração, mais cómodas para o doente, como a via oral, usando estabilizares do HIF e inibidores do GATA, entre outros. As mudanças pretendem ainda alcançar uma facilidade na produção e armazenamento.

Objetivos: Este trabalho visa: 1 - desenvolver uma revisão aprofundada sobre a regulação da produção da Eritropoietina e respetivas funções, abordando a interação com o sistema HIF; 2- Abordar o tratamento para a anemia da Doença Renal Crónica, com especial enfoque nos novos agentes estimuladores da eritropoiese.

Metodologia: O trabalho baseia-se na pesquisa na base de dados *PubMed* de artigos científicos publicados nesta área, seleção e análise detalhada dos mesmos.

Palavras-chave: eritropoietina, anemia, doença renal crónica, HIF, hepcidina, agentes estimuladores da eritropoiese (ESA), epoetina

ABSTRACT

About 20 years ago, the treatment of anemia of chronic renal disease was revolutionized by the introduction of human recombinant erythropoietin (EPO), approved in Europe in 1990. This effective treatment replaced the intermittent blood transfusions, but, given the relatively short half-life of the molecule, it had to be administered two to three times per week.

Later, emerged two other erythropoiesis stimulating agents with a prolonged duration of action: in 2001, darbepoetin alfa, and in 2007, CERA. These were followed, in 2012, by peginesatide, a synthetic peptide, mimetic of EPO. Despite the absence of structural homology with EPO, it is able to activate its receptor and stimulate erythropoiesis, and it only requires monthly administration.

Remains the search for new therapeutic strategies in this area, some are in the laboratory phase and others are already in clinical trials phase II-III. Besides the frequency of administration, are sought other routes of administration, more convenient for the patient, such as oral, using *HIF stabilizers* and GATA inhibitors, among others. Changes also aim to achieve an easier production and storage.

Objectives: This study aims to : 1- develop a thorough review of the regulation of erythropoietin production and its functions, addressing the interaction with the HIF system; 2- Approach treatment for anemia of chronic kidney disease, with particular focus on new ESAs.

Methodology: The study is based on the search of scientific articles in *PubMed* database, published in this area, respective selection and detailed analysis.

Keywords: erythropoietin, anemia, chronic kidney disease, HIF, hepcidin, erythropoiesis stimulating agents (ESA), epoetin

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof. Doutora Idalina Beirão, pelo incentivo, disponibilidade e orientação, e pelo grande contributo para a minha formação pessoal e profissional, também durante a unidade curricular de Semiologia Médica e Cirúrgica.

À minha avó (e madrinha), por ser a minha inspiração e pela força de viver incomparável.

Aos meus pais, por todo o amor e sacrifício, sem esquecer os valores de empenho, dedicação e trabalho que sempre me incutiram.

À minha irmã, pelo companheirismo e pelo espírito crítico.

Ao Miguel, pelo amor e carinho, apoio e incentivo.

Aos meus amigos, pela força e ajuda, fundamentais à concretização desta etapa.

ÍNDICE

Índice.....	1
Abreviaturas.....	2
Introdução.....	4
HIF.....	7
Hepcidina.....	11
Anemia da DRC.	13
Tratamento.....	15
Terapêutica com ferro.....	17
ESA no tratamento da anemia.....	19
rHu-EPO modificadas: novas aplicações além do tratamento da anemia.....	21
Novos estimuladores da eritropoiese	
Proteínas de fusão.....	23
Estabilizadores do HIF.....	25
Moduladores de hepcidina.....	26
Inibidores de GATA-2.....	28
Terapia génica.....	29
Conclusão e perspectivas futuras.....	32
Referências bibliográficas.....	33

ABREVIATURAS

2OG: 2-oxoglutarato

bHLH: domínio basic helix-loop-helix

BMP-6: proteína morfogenética óssea 6

CBP: CREB-binding protein

CERA: ativador contínuo do EPO-R

CFU-E: unidades formadoras de colónias eritroides

CPER: células produtoras de EPO

DCYTB: duodenal cytochrome b

DMT1: divalent metal transporter-1

DRC: doença renal crónica

DRT: doença renal terminal

EPO: eritropoietina

EPO-R: recetor da EPO

ERH: elementos de resposta à hipoxia

ESA: agentes estimuladores da eritropoiese

FDA: Food and Drug Administration

FIH: fator de inibição do HIF

GLUT-1,3: glucose transporter-1,3

HIF: hypoxia induced factor

HNF4: fator nuclear de hepatócito-4

IGF-2: insulin-like growth factor 2

IGFBP: insulin-like growth factor-binding protein

IL: interleucina

MAPK/ERK: Mitogen-Associated Protein Kinase/extracellular signal-related kinase

MHC: major histocompatibility complex

ODD: domínio de degradação dependente de oxigênio

PAS: PER/aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT)/single minded (SIM)

PEG: polietileno glicol

PGA: produtos de glicosilação avançada

PHD: proteínas de domínio prolil-4-hidroxilase

PI-3K/AKT: phosphatidylinositol-3-kinase/Protein kinase B

Pro: prolina

rHu-EPO: EPO humana recombinante

SH2: src homology 2

STAT 5: signal transduction and activator of transcription 5

TGF- α : transforming growth factor- α

VEGF: vascular endothelial growth factor

VHL: von Hippel-Lindau tumor supressor

INTRODUÇÃO

A eritropoietina (EPO) é uma hormona glicoproteica, cuja função é controlar a produção de eritrócitos, promovendo a sobrevivência, a diferenciação e a proliferação das células progenitoras eritróides na medula óssea (1) (2). O principal mecanismo subjacente à sua função consiste na prevenção da apoptose destas células (3).

O gene da EPO humana encontra-se localizado no cromossoma 7 (4). A EPO é uma proteína composta por 165 aminoácidos, fortemente glicosilada, com uma massa molecular de cerca de 30 kDa, 40% associada a carboidratos (5).

No adulto, é sintetizada principalmente no rim (6), pelos fibroblastos peritubulares intersticiais (7). As células produtoras de EPO renais (CPR) encontram-se maioritariamente no córtex renal (predominantemente na região justamedular) e na zona medular externa. O rim responde à hipoxia aumentando o número de CPR, através de um mecanismo dependente de oxigénio, que regula a produção de EPO (8).

No caso de doença renal crónica (DRC), as CPR transformam-se em miofibroblastos, produtores de colagénio e fibrose, com consequente perda da capacidade de síntese de EPO (9).

É de salientar que, durante o desenvolvimento embrionário, o órgão responsável pela produção de EPO é o fígado (10). De forma semelhante ao rim, o fígado responde à hipoxia através do aumento do número de hepatócitos produtores de EPO, que se localizam ao redor da veia central (11). A EPO também foi detetada nas células hepáticas estreladas, previamente denominadas por células de Ito (12). No fígado adulto, os níveis de mRNA de EPO aumentam substancialmente em condições de hipoxia moderada a severa, sendo uma das fontes mais relevantes de EPO de origem extra-renal. Apesar da produção de EPO, no fígado, não normalizar os valores de hemoglobina na DRC, o HIF hepático pode ser suficientemente estimulado por abordagens farmacológicas de correção de anemia resultante de produção inadequada de EPO ou condições inflamatórias (13).

Além do fígado e do rim, os dois principais locais de síntese de EPO, a expressão de mRNA de EPO foi detetada em tecidos não hematopoiéticos como cérebro (neurónios e células gliais), pulmões, coração, medula óssea, baço, folículos pilosos, sistema

reprodutivo, ilhéus pancreáticos e osteoblastos (14) (15) (16). Apesar do papel destas células na eritropoiese, sob condições basais, não estar demonstrado, podem contribuir, em parte, para a eritropoiese induzida pelo stress (17). Na verdade, a EPO sintetizada por estas células tende a atuar mais localmente, modulando, por exemplo, a angiogénese e a viabilidade celular regionais (18).

Outras funções

A EPO age de forma coordenada, a vários níveis, no que se inclui: limitar a produção de moléculas, como as espécies reativas de oxigénio e o glutamato (19), reverter o vasoespasmo (20), atenuar a apoptose (21), modular a inflamação (22) e recrutar células estaminais (23).

Possui outras funções biológicas que não se relacionam com a eritropoiese, tais como a mitogénese e a angiogénese, parcialmente via indução da endotelina-1 (24). Assim, perante um período isquémico previsível, como transporte de rins para transplantes ou cirurgia abdominal com clamping das artérias renais, a EPO recombinante pode ser utilizada como protetora do tecido renal (25) (26). Do mesmo modo, pode desempenhar um papel importante na redução do stress oxidativo e disfunção vascular associados à DRC (27). A EPO impede a apoptose das células epiteliais tubulares e estimula a atividade mitótica da população celular sobrevivente (28).

No sistema nervoso central, a EPO está envolvida na neuroproteção, na neurogénese e na angiogénese, desempenhando um papel importante como fator neurotrópico e imunomodulador (29). A angiogénese promove a neurovascularização, o que possibilita a revascularização de uma zona isquémica e o aumento do aporte de oxigénio (30). Concomitantemente ocorre um aumento na produção de stem cells neuronais (31), bem como a respetiva diferenciação em astrócitos e/ou oligodendrócitos (32).

Os efeitos protetores da EPO foram estudados *in vitro* com cardiomiócitos de rato adulto e *in vivo* num modelo de rato de enfarte do miocárdio com reperfusão. A atividade anti-apoptótica da EPO é responsável pela redução de 50% da perda de cardiomiócitos, o que resulta na normalização da função hemodinâmica (33). Devido à redução da morte celular, há uma atenuação da resposta compensatória hipertrófica e da inflamação, o que previne também um remodeling desajustado (34).

O efeito protetor da EPO também se observou na pele, com melhoria da cicatrização de feridas, redução da resposta inflamatória e aumento da densidade de vasos capilares em regiões isquêmicas, permitindo uma recuperação mais rápida da área lesada (35).

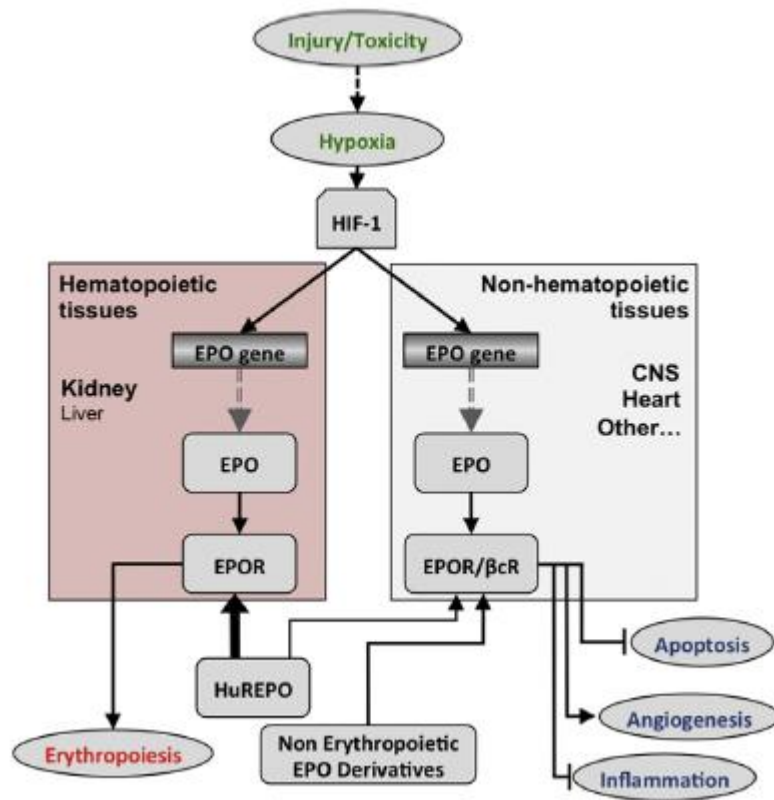


Fig.1 ⁽³²⁾: A EPO é um fator de crescimento hematopoiético cuja produção é regulada pela hipoxia. Nestas condições, ocorre um aumento da sua expressão e do EPOR, em vários tecidos. Este aumento conduz à eritropoiese em tecidos hematopoiéticos ou à indução da angiogénese e inibição da apoptose e inflamação em tecidos não hematopoiéticos.

HIF

A produção de EPO é primariamente estimulada pela hipoxia e controlada a nível transcricional (36). Dependendo da severidade, os níveis séricos podem aumentar até várias centenas de vezes (37).

Assim que a EPO se liga ao dímero EPO-R induz a estimulação da tirosina quinase JAK2, cuja ativação conduz à fosforilação de várias proteínas, incluindo o próprio EPO-R (38). Desta forma, diferentes vias intracelulares são ativadas: STAT5, PI-3K/AKT, MAPK/ERK e proteína quinase C (39). A ativação de JAK2 origina também vários locais de ligação para proteínas de sinalização intracelulares com domínios SH2 (1).

O promotor da EPO (5') é suprimido pelo GATA-2 em condições de normoxia (40), sendo que, sob hipoxia, os níveis de GATA-2 decrescem (41). Por outro lado, o *enhancer* da EPO (3') é ativado pelo HIF.

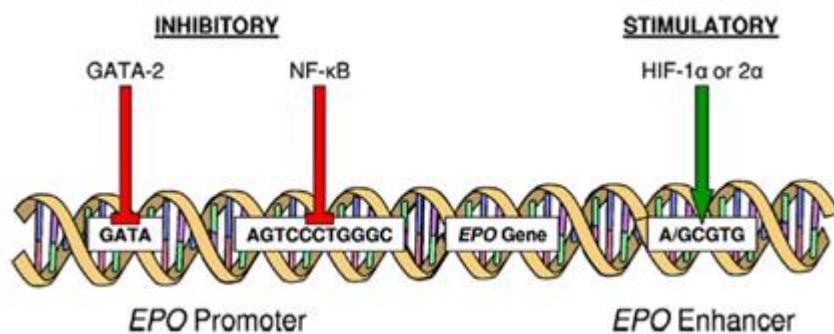


Fig.2 ⁽⁴²⁾: Regulação da expressão gênica da EPO, através de fatores transcricionais que suprimem o seu promotor ou ativam o seu *enhancer*.

O HIF é uma proteína heterodimérica que contém o domínio basic helix-loop-helix (bHLH) e pertence à família dos fatores de transcrição PAS. Consiste numa subunidade α indutível e numa subunidade β expressa constitutivamente. São conhecidas três α subunidades: HIF-1 α , HIF-2 α e HIF-3 α . Conjuntamente com o HIF-2 α , o HIF-1 α facilita a distribuição de oxigénio e a adaptação celular à hipoxia, através da estimulação de um amplo espectro de processos biológicos. Na verdade, o número de genes ativados pelo HIF, que se conhecem, continua a aumentar e inclui genes cujas proteínas estão envolvidas na angiogénese (VEGF), no metabolismo energético,

na eritropoiese, na proliferação e viabilidade celular, na biogénese mitocondrial, no remodeling vascular e nas respostas vasomotoras (43) (44). A eritropoiese e a angiogénese representam respostas adaptativas para melhorar a oxigenação dos tecidos, que requerem vários dias para se desenvolver, por exemplo, o tempo necessário para o aparecimento de eritrócitos maduros na circulação, mediado pela EPO, é de cerca de uma semana.

O HIF também medeia respostas adaptativas à hipoxia a curto prazo, regulando transcricionalmente vários transportadores de glicose (GLUT-1,3) e enzimas glicolíticas, bem como genes envolvidos no crescimento e sobrevivência celular (IGF-2, IGFBP e TGF- α) (45). A indução de enzimas glicolíticas demonstra o papel do HIF na adaptação celular autónoma à hipoxia, produzindo-se ATP não pela fosforilação oxidativa, mas pela glicólise (46).

Os genes ativados via HIF estão também envolvidos em aspetos cruciais da biologia do cancro, como a angiogénese, a sobrevivência celular, o metabolismo da glicose e a invasão (47). No processo metastático, o recetor de quimiocina CXCR4 é um alvo direto do HIF (48).

Os genes regulados pelo HIF são induzidos assim que os heterodímeros do HIF se ligam a sequências específicas de DNA e são recrutados os cofatores transcricionais. Estas sequências encontram-se nas regiões regulatórias de vários genes, sensíveis ao oxigénio e são denominados por elementos de resposta à hipoxia (ERH) (5).

Em condições de normóxia, as três subunidades α do HIF são rapidamente degradadas por proteossomas, após ligação com o VHL, substrato de reconhecimento ao complexo da ubiquitina ligase E3, que medeia a ubiquitinação do HIF (49). Esta ubiquitinação impede a formação de heterodímeros transcricionalmente ativos e requer a hidroxilação de resíduos específicos de prolina (Pro 402 e Pro 564 no HIF-1 α ; Pro 405 e Pro 531 no HIF-2 α), que estão localizados nos domínios de degradação dependentes de oxigénio (ODD: encontram-se no terminal C do HIF α) (50). A inativação do HIF por hidroxilação é realizada por três principais oxigenases dependentes do 2-oxoglutarato (2OG) – as proteínas de domínio prolil-4-hidroxilase (PHD) – PHD1, PHD2 e PHD3, que funcionam como sensores primários de oxigénio, no controlo da produção de EPO. As PHD são expressas no rim onde controlam a atividade do HIF (51).

Em condições de hipoxia, a hidroxilação é inibida e a sinalização do HIF é ativada. Uma segunda via de transcrição do HIF relaciona-se com o FIH (fator de inibição do HIF). Trata-se de uma oxigenase 2OG, que catalisa a hidroxilação de um resíduo de asparagina pertencente ao domínio de transativação do terminal carboxilo do HIF α , inibindo assim a ligação dos coativadores CBP/p300 ao seu complexo transcricional. Nesse sentido, o inverso – a inativação do FIH – facilita a seleção de CBP/p300, resultando no aumento da expressão do gene alvo do HIF, sob hipoxia (52). No rim, o FIH já foi detetado nas CPER, nos podócitos e no túbulo distal (53).

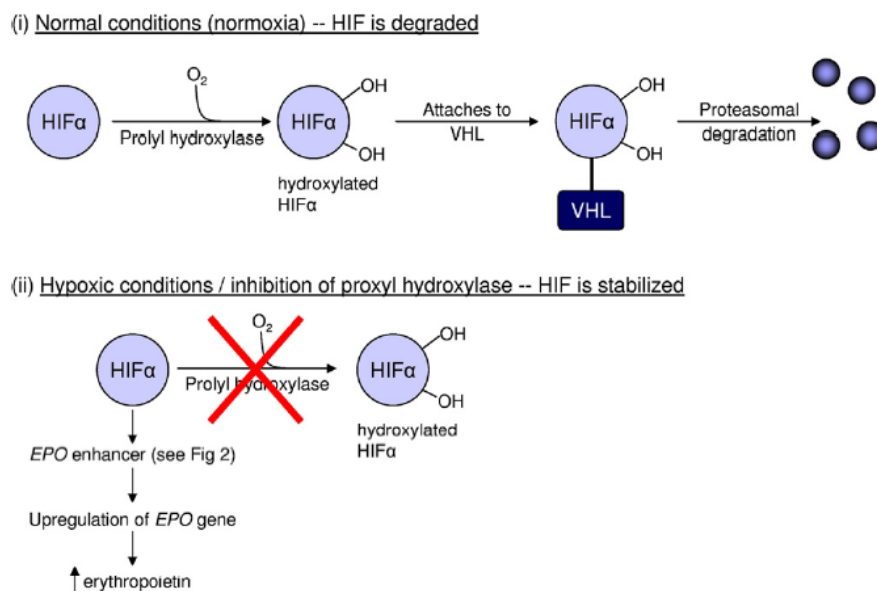


Fig. 3 ⁽⁴²⁾: Regulação da atividade do HIF, dependendo da disponibilidade de oxigénio.

Embora os estudos *in vitro* tenham identificado o HIF-1 como o fator de transcrição responsável pela indução da EPO, em casos de hipoxia (54), o HIF-2 surge agora como o principal regulador da produção de EPO, *in vivo* (55). Na verdade, é o responsável pela prevenção da apoptose das células progenitoras eritroides e pela manutenção de uma eritropoiese normal, sendo essencial para o aumento da produção de eritrócitos, em casos de hipoxia (56). A sua transativação nos HRE da EPO envolve múltiplos fatores nucleares que se associam com o gene da EPO. Um destes fatores é o HNF4 (fator nuclear de hepatócito-4), que se liga ao *enhancer* da EPO, permitindo a interação com o HIF-2 (57). À semelhança do HIF-2, a localização

celular da expressão do HNF4 coincide com os locais de produção da EPO no rim e no fígado.

Importa acrescentar que níveis intracelulares baixos de ferro demonstraram diminuir a tradução do HIF-2 α e, portanto, é previsível que limitem a produção de EPO induzida pelo HIF-2 e a eritropoiese, quando as reservas celulares de ferro estão depletadas, já que, fisiologicamente, a eritropoiese não ocorre na ausência de ferro (58).

Hepcidina

Quando a eritropoiese é estimulada pela produção de EPO no rim e fígado, mediada pelo HIF-2, a quantidade de ferro na medula óssea aumenta. A necessidade de ferro adicional implica um aumento na absorção intestinal de ferro e na capacidade de ligação do ferro, bem como um aumento na mobilização de ferro a partir das reservas internas. Assim, o HIF-2, além de regular a produção renal e hepática de EPO, também desempenha um papel crítico na absorção e utilização de ferro, uma vez que regula diretamente o DMT1 e o DCYTB (14).

Na coordenação da produção da EPO com o metabolismo do ferro intervém também a hepcidina, um regulador da homeostasia do ferro sistêmico, codificado pelo gene HAMP (59). Trata-se de um pequeno péptido constituído por 25 aminoácidos, maioritariamente produzido pelos hepatócitos, cuja transcrição é sensível ao ferro e ao oxigénio. Além das suas propriedades antimicrobianas, a hepcidina controla a quantidade de ferro absorvido no duodeno e a libertação de ferro a partir de células do sistema retículo-endotelial (como células de Kupffer e macrófagos esplénicos), através da internalização e degradação da ferroportina, que se expressa nos enterócitos duodenais, nos hepatócitos e nos macrófagos (60). A regulação da hepcidina é complexa, mas um dos principais estímulos para a sua produção é a IL-6, produzida como parte da resposta inflamatória, aliada a moléculas como a hemojuvelina e a BMP-6 (61). A hemojuvelina liga-se de forma competitiva à BMP, o que impede a sinalização do seu recetor e suprime a produção da hepcidina (62). Em casos de deficiência de ferro (como anemia por deficiência de ferro) e/ou situações de hipóxia, o fígado diminui a produção de hepcidina e a absorção intestinal de ferro é reforçada. As situações crónicas de aumento de hepcidina sérica são frequentemente associadas a estados inflamatórios (IL-6 induz a transcrição da hepcidina via JAK/STAT), o que reduz a expressão da ferroportina e causa hipoferremia (63), suportando o papel fundamental da hepcidina na patogénese da anemia de doença crónica (64).

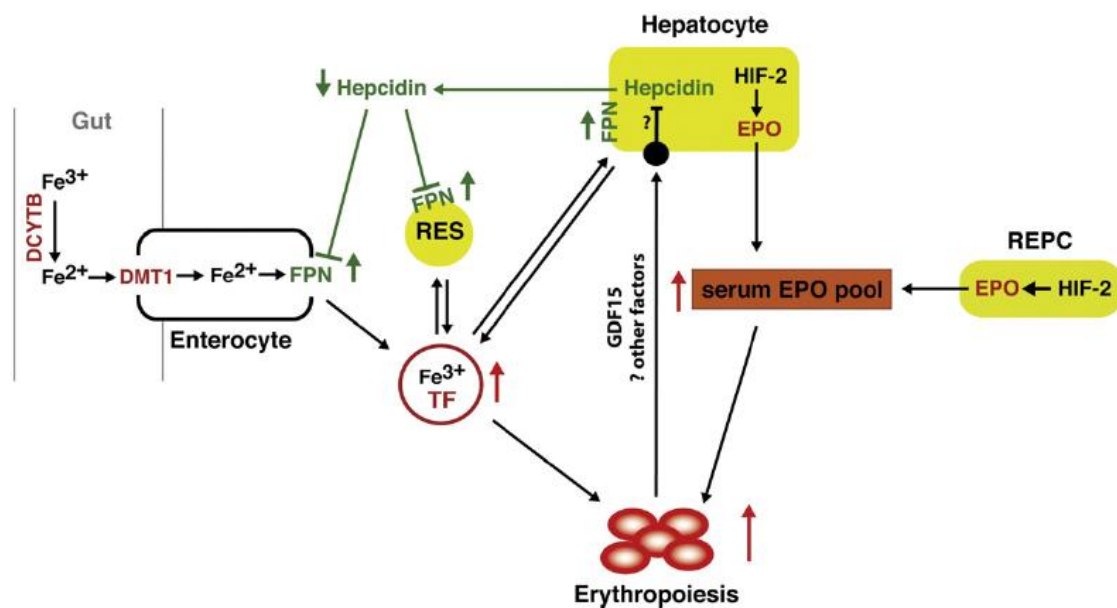


Fig. 4 ⁽¹⁴⁾: A supressão da hepcidina, devido à hipoxia ou à ativação hepática do HIF, é dependente da atividade eritropoiética na medula óssea. O HIF-2 induz a produção de EPO no rim e no fígado, consoante a gravidade da hipoxia, resultando num aumento dos níveis séricos de EPO e na estimulação da eritropoiese, que posteriormente leva à supressão da hepcidina no fígado (55). Em suma, o HIF-2 é um regulador direto da síntese de EPO renal e hepática, mas regula a hepcidina apenas de uma forma indireta, através da estimulação da atividade da medula óssea (59) (65).

ANEMIA DA DRC

A anemia é definida pela Organização Mundial de Saúde como uma concentração de hemoglobina inferior a 12 g/dl em mulheres e inferior a 13 g/dl nos homens (66).

Uma grande parte dos doentes com DRC desenvolve anemia ao longo do curso da sua doença, constituindo um fator de risco associado a pior prognóstico (67), quer como fator preditor independente, quer como multiplicador do risco em doentes com doença cardiovascular concomitante (68). A prevalência de anemia aumenta à medida que a função renal se agrava para valores de taxa de filtração glomerular menores ou iguais a 60ml/min/1.73 m² (67). No estadio 5 da DRC, a anemia já surge como uma condição praticamente universal (69). A severidade da anemia relaciona-se com o grau de perda de filtração glomerular, mas é independente da causa de doença renal. Excetua-se a doença renal poliquística, cuja concentração de EPO sérica (e hemoglobina) tende a ser maior, devido ao aumento da produção de EPO pelas células que revestem os quistos (68) (70).

Trata-se de uma anemia normocítica e normocrômica – a não ser que esteja sobreposta uma deficiência de ferro – e hipoproliferativa, devido à reduzida atividade eritropoiética na medula (70). A contagem de reticulócitos é, portanto, inadequadamente baixa para o grau de anemia, sendo também importante excluir outras causas, como perdas hemáticas, doença hematológica maligna ou deficiência de ferro, vitamina B12 ou ácido fólico (71).

Na DRC, a principal causa de anemia é a deficiente produção de EPO, devido à diminuição da expressão génica da EPO, causando um défice na produção de eritrócitos (72).

Conjuntamente, o ambiente urémico associado ao estado inflamatório crónico é o responsável pela diminuição da sobrevivência eritrocitária e pela inibição da eritropoiese (73). Na verdade, nos doentes com DRC, os níveis de IL-1, IL-6 e TNF- α encontram-se significativamente aumentados, tanto pela diminuição da sua clearance, como pelo aumento da sua produção (74). Estas citocinas pró-inflamatórias contribuem para a anemia e resistência à eritropoietina (75), por perturbarem o desenvolvimento eritróide, através da inibição dos seus precursores na medula óssea (76). Além disso, a própria insuficiência renal contribui para a inflamação, já que à medida que diminui a taxa de filtração glomerular, ocorre um aumento dos níveis dos produtos de glicosilação

avançada (PGA) e uma redução da atividade antioxidante do plasma (77). A perda de antioxidantes como o zinco, o selênio e as vitaminas C e E potencia a suscetibilidade à lesão oxidativa (78).

Neste estado inflamatório, ocorre um aumento na liberação hepática de hepcidina, com aumento da ferritina sérica, diminuição do ferro sérico e da saturação de transferrina, com consequente restrição na disponibilidade de ferro para a eritropoiese (79). A produção de ferritina, mediada pelo IL-6, resulta na retenção de ferro no espaço intracelular do sistema reticuloendotelial (80) (81).

O próprio hiperparatireoidismo secundário à insuficiência renal pode exacerbar a anemia, ao causar fibrose na medula óssea (70). Por fim, existem muitos outros fatores que contribuem para a patogênese da anemia na DRC: deficiências hematínicas (particularmente ferro e ácido fólico), toxicidade pelo alumínio, hemólise de baixo grau e hemorragias (especialmente gastrointestinais) (73).

TRATAMENTO

A EPO humana recombinante (r-HuEPO) foi introduzida como um tratamento dirigido para a anemia associada à DRC em 1989 (nos Estados Unidos) e 1990 (na Europa). Até então, os doentes anêmicos eram primariamente controlados através de transfusões sanguíneas em intervalos de 2 a 3 semanas e, em menor grau, com esteroides anabolizantes, ambos os métodos com graves limitações. As transfusões regulares aumentavam o risco de infecção, a sobrecarga de ferro e a probabilidade de desenvolver hipersensibilidade a antigénios do MHC, diminuindo a probabilidade de sucesso de transplante renal (42) (66). Não obstante, a terapêutica esteróide levava frequentemente a situações de hirsutismo, virilização e hepatotoxicidade, pelo que a sua limitada eficácia não sustentava a sua continuação (82).

Atualmente, o tratamento farmacológico para a anemia nos insuficientes renais crónicos inclui a terapia com agentes estimuladores da eritropoiese (ESA) e suplementação por ferro (83).

São designados por ESA todos os agentes capazes de aumentar direta ou indiretamente a ação do EPO-R. Consistem em glicoproteínas manufaturadas por tecnologia de recombinação de DNA, com a mesma atividade biológica que a EPO endógena (84).

A administração de um ESA implica uma série de decisões que devem ser tomadas antes de iniciar a terapia. Estas envolvem a escolha do ESA, a sua dose inicial, a frequência e via de administração, a monitorização dos níveis de hemoglobina, a previsão para um aumento de dose e a antecipação dos ajustes da dose relacionados com os níveis de hemoglobina, hospitalizações e efeitos laterais (84).

Para minimizar os possíveis riscos inerentes à terapia com EPO, deve utilizar-se a menor dose eficaz possível, visando um aumento na concentração de hemoglobina próximo de 1 g/dl por mês. A correção completa da anemia, com hemoglobina sérica >13 g/dl pode associar-se ao aumento do risco de eventos cardiovasculares e tromboembólicos (85) (86). A dose inicial de EPO deve ser de 50-100 U/ kg e deve-se considerar a administração quando o nível de hemoglobina é <10 g/dl (87).

Em doentes hemodialisados, é preferível a via intravenosa, mas a administração subcutânea pode reduzir substancialmente a sua dose (88). Em doentes pré-diálise,

transplantados ou sob diálise peritoneal, os ESA devem ser preferencialmente administrados por via subcutânea, tanto por razões económicas como práticas (89).

Efeitos adversos

O risco de efeitos adversos associados à rHu-EPO é diretamente proporcional ao aumento da hemoglobina e são mais prováveis com níveis de hemoglobina >12 g/dl, principalmente se mantidos (90).

Em doentes com DRC e doentes oncológicos, este tratamento está associado tanto a um aumento da morbilidade: trombose e eventos cardiovasculares (enfartes do miocárdio, acidentes vasculares cerebrais e insuficiência cardíaca), como da mortalidade (91). Os riscos de morte ou eventos cardiovasculares estão associados a uma má resposta hematopoiética inicial, com aumento das doses de ESA para alcançar os níveis alvo de hemoglobina (92).

Nos doentes oncológicos, o uso de rHu-EPO deve ser bem avaliado, pelo possível risco de progressão do tumor (93). A EPO tem sido associada ao bloqueio da apoptose das células tumorais, com aumento do tumor e da doença metastática, bem como diminuição dos efeitos da radioterapia, por potenciar a angiogénese tumoral (94) (95).

Nos doentes com hipertensão arterial, a rHu-EPO pode elevar significativamente a pressão arterial média, tanto na administração aguda como na continuada, pelo que o perfil tensional deve ser monitorizado (96).

A incidência de trombose venosa profunda no pós-operatório aumenta, razão pela qual deve ser instituída profilaxia anti-trombótica nos doentes tratados com rHu-EPO (97).

Terapêutica com ferro

A terapêutica com ESA aumenta as necessidades de ferro para a eritropoiese (98). A deficiência de ferro afeta mais de 50% dos doentes com DRC estádios 3/4 (99) e é uma das principais causas de ausência de resposta a esta terapia (100). A disponibilidade de ferro adequada aumenta a eritropoiese e reduz a necessidade de EPO (101). Assim, é importante monitorizar a cinética do ferro mensal ou trimestralmente, com avaliação da ferritina sérica e da saturação de transferrina (102).

O ferro deve ser administrado com o objetivo de manter os níveis de ferritina sérica superiores a 100 ng/ml e os da saturação da transferrina superiores a 20% (103). O limite superior da ferritina sérica, a partir do qual não existe recomendação para administrar rotineiramente ferro, é de 500 ng/ml. Por conseguinte, com ferritina superior a 500 ng/ml, a decisão de suplementar com ferro deve ter em conta: a capacidade de resposta à EPO, os níveis de hemoglobina e da saturação da transferrina e o estado clínico do doente (84).

Na DRC pré-diálise ou nos doentes sob diálise peritoneal, pode administrar-se suplementos de ferro oral, em particular sais ferrosos, mais eficazes e melhor absorvidos do que os férricos (104).

Apesar da terapia oral ser barata e cómoda, tem várias limitações. A interação com os alimentos pode levar à precipitação de Fe^{3+} no trato gastrointestinal, principalmente em doses elevadas (2 a 3 vezes de 60 ou 100 mg de ferro), com consequente redução da absorção. A baixa absorção de ferro, a partir do trato gastrointestinal (105) pode ser ainda exacerbada por interações medicamentosas, com inibidores da bomba de prótons, tetraciclina e quelantes de fosfato (106); e pelos níveis elevados de hepcidina associados à inflamação crónica (107). A própria oxidação de Fe^{2+} a Fe^{3+} pode levar à formação de espécies reativas de oxigénio, o que provoca dano oxidativo e toxicidade local, levando a sintomas como azia, dispepsia, vómitos e diarreia, mais frequentes com o uso de sulfato ferroso (108).

Os novos complexos estáveis não iónicos de ferro férrico, como o complexo de hidróxido férrico polimaltose (Maltofer), desenvolvidos para uso oral, têm como vantagens evitar o risco de toxicidade e melhorar a intolerância gastrointestinal, além de poderem ser ingeridos com alimentos (109). No entanto, a biodisponibilidade do ferro oral continua a ser baixa, razão pela qual devem ser tomados frequentemente

durante 2 a 3 meses, mesmo após alcançada a correção da anemia, de forma a reabastecer as reservas de ferro (110).

Se a absorção gastrointestinal se encontrar diminuída, ou houver intolerância, o doente pode receber ferro por via parentérica (111). De facto, nos doentes com DRC que ainda não fazem diálise, a resposta eritropoiética é significativamente mais elevada quando utilizado ferro intravenoso, o que pode evitar, ou pelo menos protelar, a necessidade de ESA (112) (113).

O ferro injetável é o tratamento de primeira linha para a anemia associada à DRC nos doentes hemodializados (114), que pode ser administrado durante o tratamento (115).

O primeiro composto de ferro IV aprovado era revestido por partículas de dextrano, de elevado peso molecular (centenas de kDa), o que promovia uma libertação lenta do ferro, potencialmente menos tóxico (116). No entanto, o dextrano ou, os ligandos derivados do dextrano, podem causar, raramente, reações anafiláticas eventualmente fatais, mediadas por anticorpos pré-formados. Este efeito adverso não ocorre com preparações desprovidas de dextrano, como a carboximaltose e a sacarose de ferro (117).

Os novos complexos de ferro intravenoso, como a carboximaltose férrica, o ferumoxitol e o isomaltoside 1000 podem ser administrados em doses únicas elevadas e de forma rápida (118) e não necessitam de dose teste, habitual nas preparações menos estáveis, como o gluconato de sódio férrico (119).

ESA no tratamento da anemia

Os ESA foram primeiramente aprovados para aumentar os níveis de hemoglobina em doentes com DRC avançada, em diálise ou pré-diálise (120). Atualmente, também constituem indicação para doentes submetidos a cirurgias eletivas e doentes oncológicos com anemia induzida por quimioterapia, tendo por base a diminuição da necessidade de transfusões de sangue (121).

Os primeiros fármacos a serem disponibilizados foram a epoetina alfa e a epoetina beta, duas formas de EPO recombinante, ambas altamente efetivas, mas de curta duração de ação (administradas 3 vezes por semana: semivida aproximada de 8h) (86).

Posteriormente, em 2001, surgiu uma ESA de segunda geração: a darbopoetina alfa. Trata-se de um análogo hiperglicosilado da EPO, com um número maior de resíduos de ácido siálico, o que o torna biologicamente mais potente (122). Quanto ao mecanismo de ação, age da mesma forma que a EPO nativa, estimulando o seu recetor (123). A sua grande estabilidade metabólica confere-lhe um tempo de semivida maior, comparativamente à EPO convencional, podendo ser administrada com menor frequência: uma vez a cada duas semanas (124).

Em 2007, foi aprovado, pela FDA, o agente de terceira geração CERA (ativador contínuo do EPO-R) / PEG-EPO (metoxipolietileno glicol epoetina beta), que atua, igualmente, no EPO-R. Consiste numa epoetina beta “PEGylated”, ou seja, ligada ao polímero polietileno glicol, o que lhe confere uma semivida largamente aumentada: cerca de 130 horas após a administração, quer por via intravenosa ou subcutânea (125). Assim, pode ser administrado a cada duas semanas ou mensalmente, na fase de manutenção do tratamento (126).

Outro dos agentes aprovados pela FDA foi, em 2012, o peginesatide. Trata-se de um péptido sintético “PEGylated” que, apesar de não ter homologia com a EPO, estimula o seu recetor, iniciando uma cascata de sinalização intracelular similar (também denominado EPO mimetic) (127). As suas vantagens incluem baixa imunogenicidade e maior facilidade de produção, já que não há necessidade de culturas celulares e técnicas de engenharia genética. Além disso, a terapia decorre sob a forma de uma injeção mensal, simplificando o tratamento (128).

Importa, no entanto, referir que, desde março de 2013, este tratamento apenas pode ser administrado a doentes em diálise, devido a reações de hipersensibilidade associadas à injeção, 0,02% das quais fatais (129).

rHu-EPO modificadas: novas aplicações além do tratamento da anemia

Como descrito, os ESA têm ações hematopoiéticas e efeitos adversos relacionados com essa atividade. No sentido de contornar estes efeitos, foram desenvolvidos análogos da EPO, desprovidos de atividade hematopoiética mas, que mantêm o papel protetor da EPO.

A asialo EPO é uma EPO recombinante, submetida a remoção enzimática total dos resíduos de ácido siálico, possuindo assim uma semivida plasmática muito curta (130). Possui a mesma afinidade para o EPO-R, mas, em doses e frequências nas quais a epoetina estimula a eritropoiese, esta molécula não aumenta o hematócrito (131). Possui um largo espectro de atividade neuroprotectora, sendo capaz de reduzir a lesão tecidual em modelos de isquemia cerebral, neuropatia periférica e compressão da medula espinhal e do nervo ciático. As variantes não eritropoiéticas da EPO podem então atravessar a barreira hematoencefálica e fornecer neuroproteção. (132)

A EPO carbamilada (CEPO) é uma EPO modificada que apenas possui ação protetora tecidual, sendo destituída de atividade eritropoiética. Tem uma baixa afinidade para o EPOR, sendo sugerido que os seus efeitos são mediados por um heterorreceptor formado pelo EPO-R e pelo recetor comum beta (133). Apresenta atividade neuroprotetora em modelos de isquemia cerebral, neuropatia diabética, encefalomielite autoimune e hemiseção medular (134) (135). Importa acrescentar que um estudo desenvolvido por Mahmood et al. avaliou o efeito da infusão intraperitoneal de EPO e de CEPO, num modelo de rato com traumatismo crânio-encefálico. Concluíram que tanto a EPO como a CEPO são igualmente eficazes a promover a aprendizagem espacial e a plasticidade neural, mas, com a EPO, o hematócrito aumentou significativamente (136).

Por fim, a neuroEPO. Trata-se de uma EPO humana recombinante, com um conteúdo reduzido de ácido siálico: 4-7 mol/mol de proteínas, razão pela qual é rapidamente degradada pelo fígado. De forma a prevenir a degradação hepática, esta molécula pode ser administrada via intranasal, com doses significativamente menores do que as utilizadas na administração intravenosa (137). É o único derivado da EPO testado por via intranasal, tratando-se de uma opção mais segura e mais rápida (138). Tal como os análogos anteriores, apresenta efeitos neuroprotetores, podendo diminuir as regiões isquémicas e o edema cerebral, bem como melhorar resultados neurocomportamentais em modelos animais (139). Pode também atenuar dificuldades

de aprendizagem induzidas por isquemia, através da potenciação da transmissão sináptica, da ativação de cálcio e da libertação de neurotransmissores (140).

Comparativamente com as duas variantes da EPO descritas, a neuroEPO parece tratar-se da melhor opção terapêutica para AVCs e como neuroprotetor em geral (137). Na verdade, não apresenta qualquer modificação química que a diferencie biologicamente da EPO endógena, traduzindo-se numa potencial vantagem no tratamento de doenças crônicas neurodegenerativas (141).

Novos estimuladores da eritropoiese

- Proteínas de fusão

A EPO liga-se ao EPO-R através de dois domínios de ligação: um com elevada afinidade para o recetor e outro com baixa afinidade, necessário para a ativação. Baseado na hipótese de que a presença de duas moléculas de EPO podem representar dois locais de ligação de alta afinidade e facilitar a ligação ao EPO-R, surgiu a EPO-EPO (142). Trata-se de uma proteína de fusão, que consiste em duas moléculas de EPO ligadas por um pequeno peptído flexível, cujo peso molecular é de 76 kDa (143). Este dímero tem uma elevada afinidade para o EPO-R e, em comparação com a rHu-EPO, exibe um aumento da atividade *in vitro* e *in vivo*. O comprimento do ligante peptídico que separa os dois domínios da EPO pode influenciar a atividade da molécula – o seu aumento resulta em redução da atividade para um nível comparável ao de rHu-EPO (144). Em ratinhos, uma administração subcutânea única aumentou a produção de eritrócitos em 7 dias, numa dose em que a epoetina é ineficaz (144).

Outra proteína de fusão dimérica incorpora a EPO e o fator estimulador de colónias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), já que o GM-CSF é necessário numa fase inicial da eritropoiese, antes da expressão do EPO-R. A EPO-GM-CSF foi capaz de estimular a eritropoiese em macacos (145). No entanto, induziu a produção de anticorpos anti-EPO e uma anemia severa (146).

Outra abordagem consiste na fusão genética da região Fc de IgG humana com a EPO: EPO-Fc (147). Trata-se de uma molécula quimérica com uma única EPO ligada ao dímero Fc, devido à tendência natural das regiões Fc se associarem. A modificação molecular aumenta o tamanho da proteína e promove a reciclagem para fora da célula, o que aumenta a semivida de circulação (148). O mesmo efeito pode ser conseguido através da fusão de EPO com albumina (149).

Num ensaio de fase I, a EPO-Fc foi administrada sob a forma de aerossol e demonstrou um aumento dos níveis de EPO, com um aumento moderado na contagem de reticulócitos (150).

Num ensaio posterior, realizado em roedores e primatas anémicos, a administração de rHu-EPO-Fc melhorou a produção de reticulócitos, com reversão rápida e eficiente da

anemia. Em comparação com a administração de rHu-EPO três vezes por semana, uma administração semanal de rHu-EPO-Fc revelou eficácia semelhante, ao nível da eritropoiese (151).

Por fim, o CTNO 528 é uma proteína resultante da fusão de um péptido mimético de EPO (EMP1) e a região Fc da IgG1 humana. Tem uma semivida aumentada, mas nenhuma semelhança estrutural com a EPO (144).

Comparativamente ao tratamento com epoetina ou darbepoetina alfa, os ratos tratados com uma dose única subcutânea de CTNO 528 demonstraram um aumento da reticulocitose e da hemoglobina (152).

Um ensaio de fase 1, em indivíduos saudáveis, demonstrou um efeito semelhante, após uma administração intravenosa única, cujo aumento da contagem de reticulócitos e da concentração de hemoglobina foi dependente da dose (efeito máximo aos dias 8 e 22, respetivamente). Verificou-se um aumento dos níveis endógenos de EPO, dependente da dose, e uma elevação mantida da hemoglobina, de pelo menos 1 g/dl, após uma única administração (153). O CTNO 528 foi bem tolerado e nenhum dos participantes desenvolveu anticorpos contra a molécula (154).

Outra molécula semelhante, o CNTO 530, consiste na fusão de duas moléculas de EMP1 com a região Fc da IgG4 humana (155). Num modelo de rato anémico por DRC, a administração de CNTO 530 provocou aumentos de longa duração dos eritrócitos, da hemoglobina e do hematócrito, dependentes da dose. Após uma dose de 0,1 mg/kg, houve aumento dos índices eritrocitários, que se mantiveram dentro do intervalo normal durante 44 dias (156). Quando comparado com a darbepoetina- α , o CNTO 530 demonstrou superioridade na duração do efeito eritropoiético, o que pode refletir uma ação mais duradoura do CNTO 530 sobre os estágios finais da eritropoiese (157).

Apesar da potencialidade terapêutica das moléculas descritas, são necessários mais estudos para avaliar a sua segurança e comprovar a sua aplicação na anemia da DRC.

- Estabilizadores do HIF

A produção de EPO é controlada por mecanismos transcricionais e pós-transcricionais dependentes do oxigénio. A transcrição do gene da EPO é ativada pelo HIF. Em normóxia, a cadeia α de HIF é hidroxilada pelas PHD, degradada pelo proteassoma e inativada. Em hipoxia, a cadeia α não é degradada, liga-se à cadeia β , constitutivamente expressa, com ativação do HIF e indução da expressão de EPO.

A inibição das PHD resulta na estabilização do HIF e, consequentemente, na transcrição do gene da EPO. Os agentes que previnem a degradação do HIF denominam-se estabilizadores do HIF e são análogos do 2-oxoglutarato.

Vários compostos estabilizadores do HIF têm sido estudados. Uma das primeiras moléculas candidatas foi a FG-2216, sintetizada pela Fibrogen (158). A administração de FG-2216 estabiliza o HIF, promovendo a transcrição do gene da EPO e aumentando a sua síntese. Assim, estas moléculas são capazes de aumentar os níveis de EPO endógena, sem a necessidade de administrar um ESA (42).

Estes agentes têm a vantagem de serem ativos via oral, o que representa uma potencial terapia não-injetável no futuro. Além disso, são capazes de modular outros genes envolvidos na eritropoiese, nomeadamente aqueles que potenciam a utilização do ferro: transferrina, recetor da transferrina, ferroportina e DMT1 (126).

No entanto, existem desvantagens a mencionar: na fase 2 de um ensaio clínico com FG-2216, uma doente desenvolveu necrose hepática fatal, temporalmente relacionada com a administração do estabilizador do HIF (159). Além disso, várias centenas de genes sensíveis à hipoxia são também ativados pela inibição das PHD, incluindo os que estão envolvidos na regulação da glicose, na angiogénese, etc. Uma das maiores preocupações relaciona-se com a possível ativação do VEGF, o que pode potenciar o crescimento de tumores e a retinopatia diabética proliferativa (42).

Uma molécula de segunda geração estabilizadora do HIF: FG-4592, apresentada como Roxadustat em 2013, é também administrada por via oral e encontra-se em fase 3 de ensaios clínicos (160). Atua simultaneamente na produção de eritrócitos e na incorporação do ferro, razão pela qual demonstrou corrigir a anemia e manter os níveis de hemoglobina, sem necessidade de suplementação com ferro IV, em doentes com DRC em fase pré-diálise e em diálise (161).

Ao estimular a produção de EPO endógena, resulta em níveis séricos de EPO inferiores aos obtidos com rHu-Epo, o que pode ser importante na redução dos efeitos

secundários. Não foi associado ao aumento do risco de eventos cardiovasculares, trombose ou aumento da pressão arterial, que exige a introdução ou a intensificação de terapêutica anti-hipertensora (162).

- Moduladores da hepcidina

A hepcidina é uma das moléculas envolvidas na gênese da anemia e na resistência à EPO endógena (163). O aumento da sua produção também causa resistência à terapia com ESA e a sua neutralização reverte este efeito (164). Assim, uma terapêutica supressora de hepcidina pode ser capaz de redistribuir ferro dos locais de armazenamento e permitir a absorção de ferro da dieta normal. Constitui uma potencial alternativa à exigência de ferro IV, o que diminui o risco e efeitos laterais associados a esse tratamento (165). Pode ainda restabelecer a eficácia da terapia oral de ferro, no tratamento da eritropoiese com restrição de ferro e aumentar a liberação de ferro presente no RES (166).

Diminuição da produção da hepcidina:

Várias estratégias para antagonizar o efeito de hepcidina têm sido descritas. A diminuição da sua produção pode ser alcançada por interferência nas vias regulatórias.

A heparina, um glicosaminoglicano amplamente utilizado como anticoagulante, é um inibidor potente da expressão de hepcidina em linhagens de células hepáticas e em ratinhos, devido à capacidade de se ligar a BMPs (167). Em 5 doentes tratados com heparina de baixo peso molecular, para profilaxia de trombose venosa profunda, a concentração de hepcidina sérica diminuiu 80 a 85%, 2 a 5 dias após o início do tratamento, com aumento concomitante dos níveis séricos de ferro e da saturação de transferrina. A inibição da hepcidina e o aumento do ferro sérico podem ser atribuídos tanto à atividade anti-inflamatória da heparina, por diminuição de IL-6, como à atividade anti-hepcidina, através do sequestro de BMPs (168). No entanto, apesar do conhecido perfil de segurança da heparina, a atividade anticoagulante impede uma aplicação mais ampla. Neste seguimento, foi desenvolvida uma molécula de heparina não-anticoagulante, por “glycol-split”, com manutenção da capacidade de modulação das BMPs, o que resultou na supressão da hepcidina *in vitro* e *in vivo*, em ratinhos,

mesmo em ambiente inflamatório (169). Ainda tem de ser identificada a melhor estrutura da heparina para inibição da hepcidina, mas pode diferir pouco da apresentada, que demonstrou toxicidade mínima ou nula. As heparinas não-anticoagulantes têm propriedades anti-hepcidina, anti-inflamatória e também anti-tumoral, o que pode representar uma terapêutica para a anemia inflamatória em doenças crônicas e neoplasias (170).

Tendo em conta que a regulação da hepcidina é modelada por várias moléculas como BMP-6 e IL-6, também foram desenhadas terapêuticas dirigidas a esses alvos. Um dos exemplos é a dorsomorfina, uma pequena molécula inibidora do recetor tipo I de BMP, que pode reduzir tanto a expressão de hepcidina em modelos inflamatórios, como a própria resposta inflamatória generalizada (171). Um derivado da dorsomorfina, LDN-193189, demonstrou inibir a sinalização excessiva da BMP (172) e, quando usado em ratos anémicos durante 4 semanas, produziu aumentos da concentração de ferro sérico e da expressão de ferroportina, assim como uma melhoria dos níveis de hemoglobina e do hematócrito (173). No entanto, além de bloquear a via da BMP, também inibe de forma potente o VEGF e os componentes da MAPK/ERK (174). Sendo assim, ao contrário do que se pensava, não se trata de um inibidor específico da BMP, o que representa o principal desafio destes agentes.

A interrupção da ativação do gene da hepcidina, pela IL-6, também tem sido proposta (175). O Tocilizumab, um anticorpo neutralizador de IL-6, aprovado para o tratamento da artrite reumatóide, diminui os níveis de hepcidina de forma rápida e prolongada, com melhoria da anemia na doença de Castleman. Trata-se de uma doença linfoproliferativa rara, marcada pela produção excessiva de IL-6 e elevados níveis séricos de hepcidina, associada a anemia microcítica hipocrômica (176). A principal complicação do bloqueio da atividade da IL-6 parece ser um risco aumentado de infeções (177), pelo que esta terapêutica deve ser confinada ao tratamento de doenças inflamatórias graves.

Neutralização da hepcidina:

Foi gerado um anticorpo monoclonal contra a hepcidina, testado em modelo de rato anémico por inflamação (causada por *Brucella abortus* heat-killed), que demonstrou superar a resistência à EPO. Em monoterapia tem atividade limitada, mas, em conjunto com ESA, demonstrou eficácia no tratamento da anemia (178).

As lipocalinas são pequenas proteínas extracelulares, com um local de ligação de elevada plasticidade estrutural. Dada a sua estrutura simples e habilidade para reconhecer e se ligar a diversos compostos biológicos específicos, são uma boa classe de proteínas terapêuticas destinadas a bloqueios específicos (179). A anticalina PRS-080 é um derivado da lipocalina que se liga especificamente à hepcidina humana. Em macacos, a sua administração resultou na mobilização efetiva de ferro, com aumento dos níveis séricos (180). Como é uma abordagem terapêutica recente, são necessários estudos para avaliação de segurança, tolerabilidade e eficácia. O primeiro ensaio clínico em humanos teve início em 2013.

Outra das estratégias desenvolvidas consiste em oligonucleotídeos sintéticos PEGylated – spiegelmers – que se ligam especificamente, e com alta afinidade, à hepcidina. Esta ligação resulta no bloqueio da degradação da ferroportina induzida pela hepcidina, o que leva a um aumento da concentração de ferro sérico (181). Estes agentes terapêuticos são atrativos devido à elevada resistência a nucleases, boa estabilidade in vivo e baixa imunogenicidade (182). O spiegelmer anti-hepcidina NOX-H94 foi testado em macacos com anemia, causada pela injeção diária de IL-6 durante uma semana. A administração concomitante de NOX-H94 diminuiu o desenvolvimento de anemia (183). Num ensaio de fase I, a administração de NOX-H94 foi segura e bem tolerada, e após uma dose única, ocorreu um aumento do ferro sérico e da saturação de transferrina, dependente da dose (184). No entanto, foi demonstrado que a administração dos spiegelmers conduz a uma acumulação dos oligonucleotídeos nos macrófagos, em todo o corpo, sendo desconhecido se essa administração sistêmica crônica resulta em efeitos adversos (185).

Por fim, estes tratamentos experimentais para a anemia na DRC não são isentos de riscos. A maior disponibilidade de ferro pode promover ou agravar infeções, razão pela qual cada intervenção deve ser adequadamente avaliada (186).

- Inibidores de GATA-2

A capacidade de regular positivamente o gene da EPO, através da inibição do GATA-2, também tem sido investigada. O GATA-2 inibe a expressão do gene da EPO, ao atuar no seu promotor, pelo que a sua inibição pode estimular a expressão do gene da EPO e a sua produção, o que aumenta a eritropoiese (187). Existem dois inibidores do fator de transcrição GATA reportados: K-7174 e K-11706. Ambos demonstraram

potenciar a produção de EPO e o seu promotor, previamente suprimido por IL-1 e TNF- α (188). A administração oral foi capaz de restaurar as concentrações de hemoglobina, a contagem de reticulócitos, os níveis de EPO e os números das CFU-E. O K-11706 parece resultar numa indução hipóxica maior do que o K-7174, provavelmente porque também estimula o HIF-1, além de inibir o GATA (189).

No entanto, tal como ocorre com os estabilizadores do HIF, existe a possibilidade da inibição do GATA promover a ativação de outros genes, como o VEGF, razão pela qual são necessários mais estudos (190).

- Terapia génica

Inicialmente, foi desenvolvido, num modelo animal, um sistema de distribuição do gene da EPO através de células da pele. A metodologia consistia em extrair uma microbiópsia de células dérmicas (microdermis), realizar transdução com o gene da EPO (através de um vetor de adenovírus) e, posteriormente, reimplantar no animal. Obteve-se uma produção de níveis elevados de EPO e um aumento do hematócrito, o que não se verificou com o vetor destituído do gene (191).

O modelo foi aplicado em ensaios clínicos, através da produção de uma bomba biológica ("BioPump"), que utiliza o próprio tecido do doente, para produzir continuamente as suas proteínas terapêuticas (192). As biópsias são obtidas a partir da camada interna da pele, sob anestesia local, e cultivadas durante 10 a 14 dias. O número necessário de Biopumps é então injetado sob a pele do doente, de forma a proporcionar a produção de proteínas e a sua distribuição durante vários meses. A Medgenics apresentou uma BioPump, denominada Epodure, que produz e fornece EPO continuamente.

Um ensaio de fase I conduzido em 2003-2004, demonstrou um aumento da EPO, dependente da dose, durante 10 a 14 dias, com consequente elevação da contagem de reticulócitos. As biopumps tiveram curta duração de ação, devido a uma resposta imune desenvolvida contra as proteínas adenovirais expressas pelas células transduzidas. Isto levou ao desenvolvimento de adenovetores "helper-dependent", de forma a prevenir a rejeição imunológica (193).

Posteriormente, em 2008-2009, um pequeno grupo de doentes com DRC participou num ensaio clínico de fase 1-2, cuja dose produzida foi de 18 a 25 IU/kg/dia. Todos apresentaram aumento da produção de EPO e a maioria demonstrou elevação

sustentada dos níveis de hemoglobina no intervalo de 10-12 g/dL, durante 6 a 12 meses, sem receber injeções adicionais de ESA (194).

Em 2010-2011, num ensaio de fase 1 em doentes anémicos pré-diálise, as dosagens de 20 e 40 UI/kg/dia não resultaram em formação de anticorpos anti-EPO e os níveis séricos de EPO não ultrapassaram 60 mU/mL (195). Uma única administração demonstrou elevação e estabilização dos níveis de hemoglobina por períodos de 6 meses a mais de 36 meses (196). A BioPump foi bem tolerada e não foram detetados efeitos adversos em 6 a 30 meses de tratamento.

Em 2012-2013, num ensaio de fase 2 com 4 doentes sob diálise, foi utilizada uma única administração de Epodure, com produção de 19 a 51 UI de EPO/Kg/dia, em substituição das injeções de ESA a cada sessão de diálise. Após a administração, a hemoglobina permaneceu entre 9 a 11 g/dl durante 2 a 4 meses, sem necessidade adicional de qualquer terapêutica. A concentração de EPO sérica não excedeu a faixa normal e manteve-se abaixo de 100 mU/ml. Não foram relatados eventos adversos graves (197). Um segundo ensaio de fase 2, com um número maior de doentes, encontra-se em desenvolvimento.

Os resultados confirmam a potência de vetores de adenovírus para transferência de genes *in vivo*, já que uma administração única do vetor com o gene da EPO humana resulta num aumento maior de eritrócitos em circulação, comparativamente com a administração única de doses elevadas de ESA (198). A implantação de tecido autólogo geneticamente modificado na derme humana pode aumentar significativamente, e de forma segura, o nível de EPO e a contagem de reticulócitos, o que constitui uma potencial alternativa terapêutica.

Regulação da produção da Eritropoietina e novas abordagens terapêuticas no tratamento da anemia da
Doença Renal Crônica

Tabela 1 – Novos agentes estimuladores da eritropoiese para o tratamento da anemia da DRC

Classe		Molécula/fármaco	Fase de desenvolvimento
Proteínas de fusão		EPO-EPO	Pré-clínica
		EPO-GM-CSF	Pré-clínica
		EPO-Fc	I
		CTNO 528	I
		CNTO 530	I
Estabilizadores do HIF		FG-2216	II
		FG-4592	III
Moduladores da hepcidina	Diminuição da produção	Heparina não anticoagulante	Pré-clínica
		Dorsomorfina LDN-193189	Pré-clínica
		Tocilizumab	Pré-clínica
	Neutralização	Atc monoclonal	I
		Anticalina PRS-080	I
		Spiegelmer NOX-H94	II
Inibidores do GATA		K-7174	Pré-clínica
		K-11706	
Terapia génica		BioPump Epodure	II

CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

A introdução da rHu-EPO revolucionou o tratamento dos doentes com DRC, ao permitir um tratamento seguro da anemia, a longo prazo, destituído dos riscos inerentes às transfusões sanguíneas. Desde então, surgiram vários ESA, caracterizados por menor frequência de administração e melhor estabilização da concentração da hemoglobina. As novas estratégias terapêuticas incluem estabilizadores do HIF e outras abordagens não injetáveis, pelo que se espera que, a curto prazo, esteja disponível uma terapêutica oral, que proporcione maior conforto ao doente e adesão ao tratamento.

Dado que a disponibilidade do ferro é um fator limitante da terapêutica e a suplementação de ferro é, geralmente, necessária para assegurar uma resposta adequada à EPO, a associação de agentes de diferentes classes seria uma abordagem a equacionar. A título de exemplo, a combinação de um estabilizador do HIF ou de uma BioPump, com um modulador da hepcidina, poderia potenciar os efeitos terapêuticos, ao ultrapassar a restrição de ferro.

As potencialidades da estimulação da eritropoiese mantêm-se sob investigação e espera-se que o desenvolvimento e aperfeiçoamento das novas terapêuticas resultem na melhoria da qualidade de vida dos doentes. Serão necessários mais estudos para avaliar a segurança e os resultados a longo prazo, de forma a tornar possível a sua aplicação aos doentes com anemia da DRC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Catherine L, Patrick M. Biology of erythropoietin. *Haematologica*. 1998; 83: p. 724-732.
2. Jelkmann W. Regulation of erythropoietin production. *The Journal of Physiology*. 2011; 589.6: p. 1251–1258.
3. MJ K, MC B. Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells. *Science*. 1990; 248: p. 378–381.
4. Marti HH. Erythropoietin and the hypoxic brain. *The Journal of Experimental Biology*. 2004; 207: p. 3233-3242.
5. Jelkmann W. Molecular biology of erythropoietin. *Internal Medicine*. 2004; 43.
6. Jacobson L, Goldwasser E E, Fried W, Plzak L. Role of the kidney in erythropoiesis. *Nature*. 1957; 179: p. 633–4.
7. Paliege A, Rosenberger C, Bondke A, Sciesielski L, Shina A, Heyman S, et al. Hypoxia-inducible factor-2alpha-expressing interstitial fibroblasts are the only renal cells that express erythropoietin under hypoxia-inducible factor stabilization. *Kidney Int*. 2010; 77: p. 312–8.
8. Obara N, Suzuki N, Kim K, Nagasawa T, Imagawa S, Yamamoto M. Repression via the GATA box is essential for tissue-specific erythropoietin gene expression. *Blood*. 2008; 111: p. 5223–32.
9. Asada N, Takase M, Nakamura J, Oguchi A, Asada M, Suzuki N, et al. Dysfunction of fibroblasts of extrarenal origin underlies renal fibrosis and renal anemia in mice. *J Clin Invest*. 2011; 121: p. 3981–90.
10. Minamishima Y, Kaelin J. Reactivation of hepatic EPO synthesis in mice after PHD loss. *Science*. 2010;: p. 329:407.
11. Obara N, Suzuki N, Kim K, Nagasawa T, Imagawa S, Yamamoto M. Repression via the GATA box is essential for tissue-specific erythropoietin gene expression. *Blood*. 2008; 111: p. 5223–32.
12. Maxwell P, Ferguson D, Osmond M, Pugh C, Heryet A, Doe B, et al. Expression of a homologously recombined erythropoietin-SV40 T antigen fusion gene in mouse liver: evidence for erythropoietin production by Ito cells. *Blood*. 1994; 84: p. 1823–30.
13. Kapitsinou P, Liu Q, Unger T, Rha J, Davidoff O, Keith B, et al. Hepatic HIF-2 regulates erythropoietic responses to hypoxia in renal anemia. *Blood*. 2010; 116:

p. 3039–48.

14. Haase VH. Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors. *Blood reviews*. 2013; 27: p. 41-53.
15. Dame C, Bartmann P, Wolber E, Fahnenstich H, Hofmann D, Fandrey J. Erythropoietin gene expression in different areas of the developing human central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res*. 2000; 125: p. 69–74.
16. Fenjves E, Ochoa M, Cabrera O, Mendez A, Kenyon N, al e. Human, nonhuman primate, and rat pancreatic islets express erythropoietin receptors. *Transplantation*. 2003; 75: p. 1356–60.
17. Rankin E, Wu C, Khatri R, Wilson T, Andersen R, Araldi E, et al. The HIF signaling pathway in osteoblasts directly modulates erythropoiesis through the production of EPO. *Cell*. 2012; 149: p. 63–74.
18. Jelkmann W. Erythropoietin after a century of research: younger than ever. *Eur J Haematol*. 2007; 78: p. 183–205.
19. Kawakami M, Sekiguchi M, Sato K, Kozaki S, Takahashi M. Erythropoietin receptor-mediated inhibition of exocytotic glutamate release confers neuroprotection during chemical ischemia. *J Biol Chem*. 2001; 276(42): p. 39469-75.
20. Grasso G. Neuroprotective effect of recombinant human erythropoietin in experimental subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg Science*. 2001; 45(1): p. 7-14.
21. Digicaylioglu M, Lipton S. Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades. *Nature*. 2001; 412(6847): p. 641-7.
22. Agnello D, Bigini P, Villa P, Mennini T, Cerami A, al e. Erythropoietin exerts an anti-inflammatory effect on the CNS in a model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res*. 2002; 952(1): p. 128-34.
23. Shingo T, Sorokan S, Shimazaki R, Weiss S. Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian neural stem cells. *J. Neuroscience*. 2001; 21(24): p. 9733–9743.
24. Westenfelder C, Biddle D, Baranowski R. Human, rat, and mouse kidney cells express functional erythropoietin receptors. *Kidney Int*. 1999; 55: p. 808–20.
25. Patel N, Sharples E, Cuzzocrea S, al e. Pretreatment with EPO reduces the injury and dysfunction caused by ischemia/reperfusion in the mouse kidney in vivo. *Kidney Int*. 2004; 66: p. 983–89.

26. Yang C, Li C, Jung J, al e. Preconditioning with erythropoietin protects against subsequent ischemia-reperfusion injury in rat kidney. *FASEB J.* 2003; 17: p. 1754–55.
27. Chatterjee P. Pleiotropic renal actions of erythropoietin. *Lancet.* 2005; 365: p. 1890–92.
28. Vesey D, Cheung C, Pat B, Endre Z, Gobe G, Johnson D. Erythropoietin protects against ischaemic acute renal injury. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2004; 19: p. 348–355.
29. Rabie T, Marti HH. Brain Protection by Erythropoietin: A Manifold Task. *Physiology.* 2008; 23: p. 263-274.
30. Wang X, Zhu C, Gerwien J, Schrattenholz A, Sandberg M, Leist M, et al. The nonerythropoietic asialoerythropoietin protects against neonatal hypoxia-ischemia as potently as erythropoietin. *J Neurochem.* 2004; 91: p. 900–10.
31. Tsai P, Ohab J, Kertesz N, Groszer M, Matter C, Gao J, et al. A critical role of erythropoietin receptor in neurogenesis and post-stroke recovery. *J Neurosci.* 2006; 26: p. 1269–74.
32. Chateauvieux S, Grigorakaki C, Morceau F, Dicato M, Diederich M. Erythropoietin, erythropoiesis and beyond. *Biochemical Pharmacology.* 2011; 82: p. 1291–1303.
33. Moon C, Krawczyk M, Ahn D, Ahmet I, Paik D, al e. Erythropoietin reduces myocardial infarction and left ventricular functional decline after coronary artery ligation in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003; 100: p. 11612–11617.
34. Calvillo L, Latini R, Kajstura J, Leri A, al e. Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003; 100: p. 4802–4806.
35. Buemi M, Vaccaro M, Sturiale A, Galeano M, al e. Recombinant human erythropoietin influences revascularization and healing in a rat model of random ischaemic flaps. *Acta Derm Venereol.* 2002; 82(6): p. 411-7.
36. Schuster S, Badiavas E, Costa-Giomi P, Weinmann R, Erslev A, Caro J. Stimulation of erythropoietin gene transcription during hypoxia and cobalt exposure. *Blood.* 1989; 73: p. 13-6.
37. Ebert B, Bunn H. Regulation of the erythropoietin gene. *Blood.* 1999; 94: p. 1864–77.
38. Lacombe C, Mayeux P. The molecular biology of erythropoietin. *Nephrol Dial Transplant.* 1999; 14 (2): p. 22-28.

39. Jelkmann W, Bohlius J, Hallek M, Sytkowski A. The erythropoietin receptor in normal and cancer tissues. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2008; 67: p. 39-61.
40. Tsuchiya T, Okada M, Ueda M, Yasukochi Y. Activation of the erythropoietin promoter by a point mutation from GATA to TATA in the -30 region. *J Biochem (Tokyo)*. 1997; 121: p. 193–196.
41. Imagawa S, Nakano Y, Obara N, Suzuki N, Doi T, Kodama T, et al. A GATA-specific inhibitor (K-7174) rescues anemia induced by IL-1 β , TNF- α , or L-NMMA. *FASEB J*. 2003; 17: p. 1742–1744.
42. Macdougall IC. New Anemia Therapies: Translating Novel Strategies From Bench to Bedside. *Am J Kidney Dis*. 2012; 59(3): p. 444-451.
43. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: Regulator of mitochondrial metabolism and mediator of. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011; 1813(7): p. 1263–1268.
44. Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol*. 2000; 88: p. 1474-1480.
45. Wenger R. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB J*. 2002; 16: p. 1151–1162.
46. Seagroves TN, Ryan HE, Lu H, Wouters BG, Knapp M, et al. Transcription Factor HIF-1 Is a Necessary Mediator of the Pasteur Effect in Mammalian Cells. *Mol. Cell. Biol*. 2001; 21: p. 3436-3444.
47. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*. 2003; 3: p. 721-732.
48. Weidemann A, Johnson R. Biology of HIF-1 α . *Cell Death and Differentiation*. 2008; 15: p. 621–627.
49. Hagg M, Stefan W. Activation of hypoxia-induced transcription in normoxia. *Exp. Cell. Res*. 2005; 306: p. 180-191.
50. Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, et al. HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science*. 2001; 292: p. 464–8.
51. Bruick R, McKnight S. A conserved family of prolyl hydroxylases that modify HIF. *Science*. 2001; 294: p. 1337-1340.
52. Kaelin JW, Ratcliffe P. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell*. 2008; 30: p. 393–402.

53. Schodel J, Bohr D, Klanke B, Schley G, Schlotzer-Schrehardt U, Warnecke C, et al. Factor inhibiting HIF limits the expression of hypoxia-inducible genes in podocytes and distal tubular cells. *Kidney Int.* 2010; 78: p. 857–67.
54. Semenza G, Wang G. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol.* 1992; 12: p. 5447–54.
55. Haase V. Hypoxic regulation of erythropoiesis and iron metabolism. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010; 299(1): p. F1–F13.
56. Jelkmann W. Erythropoietin after a century of research: younger than ever. *Eur J Haematol.* 2007; 78(3): p. 183–205.
57. Warnecke C, Zaborowska Z, Kurreck J, Erdmann V, Frei U, Wiesener M, et al. Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha (EPAS-1) by the use of RNA interference: erythropoietin is a HIF-2alpha target gene in Hep3B and Kelly cells. *FASEB J.* 2004; 18: p. 1462–4.
58. Muckenthaler M, Galy B, Hentze M. Systemic iron homeostasis and the iron-responsive element/iron-regulatory protein (IRE/IRP) regulatory network. *Annu Rev Nutr.* 2008; 28: p. 197–213.
59. Davidoff O, Liu Q, Niss K, Haase VH. Hypoxia-inducible factor regulates hepcidin via erythropoietin-induced erythropoiesis. *J Clin Invest.* 2012; 122(12): p. 4635–4644.
60. Ganz T. Molecular control of iron transport. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18: p. 394–400.
61. Kemna E, Tjalsma H, Willems H, Swinkels D. Hepcidin: from discovery to differential diagnosis. *Haematologica.* 2008; 93(1): p. 90-97.
62. Babitt J, Huang F, Sidis Y, Xia Y, Andrews N, Lin H. Modulation of bone morphogenetic protein signaling in vivo regulates systemic iron balance. *J. Clin. Invest.* 2007; 117: p. 1933–1939.
63. Andrews N. Forging a field: the golden age of iron biology. *Blood.* 2008; 112(2): p. 219–230.
64. Ganz T. Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood.* 2003; 102: p. 783–8.
65. Pak M, Lopez M, Gabayan V, Ganz T, Rivera S. Suppression of hepcidin during anemia requires erythropoietic activity. *Blood.* 2006; 108: p. 3730–5.
66. Longo , Fauci , Kasper , Hauser , Jameson , Loscalzo. Harrison. Princípios de

Medicina Interna. 18th ed.: Mc Graw Hill; 2013.

67. Nurko S. Anemia in chronic kidney disease: Causes, diagnosis, treatment. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*. 2006; 73(3).
68. Somvanshi S, Khan NZ, Ahmad M. Anemia in chronic kidney disease patients. *Clinical Queries Nephrology*. 2012; 1(3): p. 198-204.
69. Kazmi WH, Kausz AT, Khan S, al e. Anemia: An early complication of chronic renal insufficiency. *American Journal of Kidney Diseases*. 2001; 38(4): p. 803-812.
70. Macdougall IC. Anaemia and chronic renal failure. *Medicine*. ; 39(7): p. 425-428.
71. Artunc F, Risler T. Serum erythropoietin concentrations and responses to anaemia in patients with or without chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2007; 22: p. 2900–2908.
72. Santoro A. Anemia in renal insufficiency. *Rev Clin Exp Hematol*. 2002; 1: p. 12-20.
73. Macdougall IC. Role of uremic toxins in exacerbating anemia in renal failure. *Kidney International*. 2001; 59(78): p. S67-S72.
74. Stenvinkel P, Ketteler M, Johnson R, Lindholm B, Riella M, al e. IL-10, IL-6, and TNF- α : Central factors in the altered cytokine network of uremia—The good, the bad, and the ugly. *Kidney International*. 2005; 67: p. 1216–1233.
75. Kaysen GA. The Microinflammatory State in Uremia: Causes and Potential consequences. *J Am Soc Nephrol*. 2001; 12: p. 1549–1557.
76. Raj DSC. Role of Interleukin-6 in the Anemia of Chronic Disease. *Semin Arthritis Rheum*. 2009; 38(5): p. 382-8.
77. Mimic-Oka J, Simic T, Djukanovic L, Reljic Z, Davicevic Z. Alteration in plasma antioxidant capacity in various degrees of chronic renal failure. *Clin Nephrol*. 1999; 51: p. 233–241.
78. Vaziri ND. Oxidative stress in uremia: Nature, mechanisms, and potential consequences. *Seminars in Nephrology*. 2004; 24(5): p. 469–473.
79. Thomas C, Thomas L. Biochemical markers and hematologic indices in the diagnosis of functional iron deficiency. *Clin Chem*. 2002; 48: p. 1066-76.
80. Torti F, Torti S. Regulation of ferritin genes and protein. *Blood*. 2002; 99: p. 3505-3516.
81. Thomas C, Thomas L. Anemia of chronic disease: pathophysiology and laboratory diagnosis. *Lab Hematol*. 2005; 11: p. 14-23.

82. Teruel J, Marcen R, Navarro-Antolin J, Aguilera A, Fernandez-Juarez G, Ortuno J. Androgen versus Erythropoietin for the Treatment of Anemia in Hemodialyzed Patients: A Prospective Study¹. *J Am. Soc. Nephrol.* 1996; 7: p. 140-144.
83. Lankhorst CE, Wish JB. Anemia in renal disease: Diagnosis and management. *Blood Reviews.* ; 24: p. 39–47.
84. National Kidney Foundation. KDOQI Clinical Practice Guidelines and Clinical Practice Recommendations for Anemia in Chronic Kidney Disease. *Am J Kidney Dis.* 2006.
85. McMurray JJ, Parfrey P, Adamson J, al e. KDIGO clinical practice guideline for anemia in chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl.* 2012; 2(4): p. 1-335.
86. Drüeke TB. Anemia Treatment in Patients with Chronic Kidney Disease. *The New England Journal of Medicine.* 2013; 368(4): p. 387-389.
87. Fishbane S, Jhaveri KD. The New Label for Erythropoiesis Stimulating Agents: The FDA'S Sentence. *Seminars in Dialysis.* 2012; 25(3): p. 263–266.
88. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ. *Farmacologia.* 6th ed.: Elsevier; 2008.
89. Zakar G. Current issues in erythropoietin therapy of renal anemia. *Lege Artis Med.* 2007; 17(10): p. 667-673.
90. FDA. Erythropoiesis-Stimulating Agents (ESAs) - Full Version. *Drug Safety Podcasts.* 2013.
91. Maiese K, Chong ZZ, Shang YC. Raves and risks for erythropoietin. *Cytokine & Growth Factor Reviews.* 2008; 19: p. 145–155.
92. Solomon S, Lewis E, Uno H, al e. Erythropoietic response and outcomes in kidney disease and type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2010; 363: p. 1146–1155.
93. Maiese K, Li F, Chong Z. Erythropoietin and cancer. *JAMA.* 2005; 293: p. 1858–9.
94. Kokhaei P, Abdalla A, Hansson L, Mikaelsson E, Kubbies M, al e. Expression of erythropoietin receptor and in vitro functional effects of epoetins in B-cell malignancies. *Clin Cancer Res.* 2007; 13: p. 3536–44.
95. Ceelen W, Boterberg T, Smeets P, Van Damme N, Demetter P, Zwaenepoel O, et al. Recombinant human erythropoietin alpha modulates the effects of radiotherapy on colorectal cancer microvessels. *Br J Cancer.* 2007; 96: p. 692–700.
96. Kanbay M, Akcay A, Delibasi T, Kaya A, B U, al e. Comparison of effects of darbepoetin alfa and epoetin alfa on serum endothelin level and blood pressure. *Adv Ther.* 2007; 24: p. 346–52.

97. Goodnough LT, Shander A. Update on erythropoiesis-stimulating agents. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*. 2013; 27: p. 121-129.
98. Locatelli F, Aljama P, Bárány P, Canaud B, Carrera F, al e. Revised European best practice guidelines for the management of anaemia in patients with chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant*. 2004; 19: p. ii1-47.
99. Fishbane S, Pollack S, Feldman H, Joffe M. Iron indices in chronic kidney disease in the National Health and Nutritional Examination Survey 1988-2004. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009; 4: p. 57-61.
100. Hörl W. Non-erythropoietin-based anaemia management in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2002; 17: p. 35-38.
101. Besarab A, Amin N, Ahsan M, Vogel S, Zazuwa G, al e. Optimization of epoetin therapy with intravenous iron therapy in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol*. 2000; 11: p. 530-538.
102. Eschbach JW. Iron requirements in erythropoietin therapy. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 2005; 18(2): p. 347-361.
103. European Best Practice Guidelines. Section II: Targets for anaemia treatment. *Nephrol Dial Transplant*. 2004; 19: p. ii6-15.
104. Canavesi E, Alfieri C, Pelusi S, Valenti L. Hpcidin and HFE protein: Iron metabolism as a target for the anemia of chronic kidney disease? *World J Nephrol*. 2012; 1(6): p. 166-176.
105. Besarab A, Coyne D. Iron supplementation to treat anemia in patients with chronic kidney disease. *Nature Reviews Nephrology*. 2010; 6: p. 699-710.
106. Alleyne M, Horne M, Miller J. Individualized treatment for iron-deficiency anemia in adults. *Am J Med*. 2008; 121: p. 943-8.
107. Darshan D, Frazer D, Anderson G. Molecular basis of iron-loading disorders. *Expert Rev Mol Med*. 2010; 12: p. e36.
108. Tuomainen T, Nyssonen K, Porkkala-Sarataho E, Salonen R, Baumgartner J, al e. Oral supplementation with ferrous sulfate but not with non-ionic iron polymaltose complex increases the susceptibility of plasma lipoproteins to oxidation. *Nutrition Research*. 1999 19; 8: p. 1121-1132.
109. Geisser P. Safety and efficacy of iron(III)-hydroxide polymaltose complex: a review of over 25 years experience. *Arzneimittelforschung*. 2007; 57: p. 439-52.
110. Macdougall IC, Geisser P. Use of Intravenous Iron Supplementation in Chronic Kidney Disease. *Iranian Journal of Kidney Diseases*. 2013; 7(1): p. 9-22.

111. Kooistra M, Marx J. The absorption of iron is disturbed in recombinant human erythropoietin-treated peritoneal dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 1998; 13(10): p. 2578-82.
112. Qunibi W, Martinez C, Smith M, Benjamin J, Mangione A, Roger S. A randomized controlled trial comparing intravenous ferric carboxymaltose with oral iron for treatment of iron deficiency anaemia of non-dialysis-dependent chronic kidney disease patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2011; 26(5): p. 1599-607.
113. Van Wyck D, Roppolo M, Martinez C, Mazey R, McMurray S, al e. A randomized, controlled trial comparing IV iron sucrose to oral iron in anemic patients with nondialysis-dependent CKD. *Kidney Int*. 2005; 68(6): p. 2846-56.
114. MacGinley RJ, Walker RG. International treatment guidelines for anaemia in chronic kidney disease — what has changed? *MJA*. 2013; 199(2).
115. Auerbach M, Goodnough L, Shander A. Iron: The new advances in therapy. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*. 2013; 27: p. 131–140.
116. Macdougall IC. Novel agents for anemia management in chronic kidney disease. *US Nephrology*. 2010; 5(2): p. 21-6.
117. Bailie G, Clark J, Lane C, Lane P. Hypersensitivity reactions and deaths associated with intravenous iron preparations. *Nephrol Dial Transplant*. 2005; 20(7): p. 1443-9.
118. Spinowitz B, Kausz A, Baptista J, al e. Ferumoxytol for treating iron deficiency anemia in CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2008; 19: p. 1599-605.
119. IC M. Evolution of iv iron compounds over the last century. *J Ren Care*. 2009; 35(2): p. 8-13.
120. Pisoni R, Bragg-Gresham J, Young E, al e. Anemia management and outcomes from 12 countries in the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS). *Am J Kidney Dis*. 2004; 44: p. 94–111.
121. Seidenfeld J, Piper M, Flamm C, al e. Epoetin treatment of anemia associated with cancer therapy: a systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *J Natl Cancer Inst*. 2001; 93: p. 1204–1214.
122. Tsuda E, Kawanishi G, Ueda M, Masuda S, Sasaki R. The role of carbohydrate in recombinant human erythropoietin. *Eur. J. Biochem*. 1990; 188: p. 405-411.
123. Elliott S. Erythropoiesis-stimulating agents and other methods to enhance oxygen transport. *British Journal of Pharmacology*. 2008; 154: p. 529–541.
124. Macdougall IC, Padhi D, Jang G. Pharmacology of darbepoetin alfa. *Nephrol Dial*

Transplant. 2007; 22(4): p. iv2–iv9.

125. Macdougall IC, Robson R, Opatrna S, Liogier X, Pannier A, al e. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Intravenous and Subcutaneous Continuous Erythropoietin Receptor Activator (C.E.R.A.) in Patients with Chronic Kidney Disease. Clin J Am Soc Nephrol. 2006; 1: p. 1211–1215.
126. Macdougall IC. Novel Erythropoiesis-Stimulating Agents: A New Era in Anemia Management. Clin J Am Soc Nephrol. 2008; 3: p. 200–207.
127. Macdougall IC, Provenzano R, Sharma A, Spinowitz BS, Schmidt RJ, Pergola PE, et al. Peginesatide for Anemia in Patients with Chronic Kidney Disease Not Receiving Dialysis. The New England Journal of Medicine. 2013; 368(4): p. 320-332.
128. Nandha R, Maheshwari A, Sekhri K, Aditya S. Peginesatide- A Novel Erythropoietin Mimetic Agent for the treatment of anaemia in chronic renal failure patients. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. 2013; 4(6): p. 2184-2189.
129. National PBM Communication. Peginesatide (Omontys®) Injection Recall Due to Serious Hypersensitivity Reactions. Department of Veterans Affairs Veteran Health Administration. 2013.
130. Imai N, Higuchi M, Kawamura A, Tomonoh K, Oh-Eda M, al e. Physicochemical and biological characterization of asialoerythropoietin. Suppressive effects of sialic acid in the expression of biological activity of human erythropoietin in vitro. Eur. J Biochem. 1990; 194: p. 457-462.
131. Wang X, Zhu C, Wang X, Gerwien JG, Schrattenholz A, Sandberg M, et al. The nonerythropoietic asialoerythropoietin protects against neonatal hypoxia-ischemia as potently as erythropoietin. Journal of Neurochemistry. 2004; 91: p. 900–910.
132. Erbayraktar S, Grasso G, Sfacteria A, Xie Qw, Coleman T, al e. Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo. PNAS. 2003; 100(11): p. 6741–6746.
133. Genc S, Zadeoglulari Z, Gulfem Oner M, Genc K, Digicaylioglu M. Intranasal erythropoietin therapy in nervous system disorders. Expert Opin. Drug Deliv. 2011; 8(1): p. 19-32.
134. Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, al e. Erythropoietin Therapy for Acute Stroke Is Both Safe and Beneficial. Molecular Medicine. 2002; 8(8): p. 495–505.
135. King V, Averill S, Hewazy D. Erythropoietin and carbamylated erythropoietin are neuroprotective following spinal cord hemisection in the rat. Eur. J. Neuroscience. 2007; 26: p. 90-100.

136. Mahmood A, Lu D, Qu C, Goussev A, Gang Z, Lu C, et al. Treatment of traumatic brain injury in rats with erythropoietin and carbamylated erythropoietin. *Journal of Neurosurgery*. 2007; 107(2): p. 392-397.
137. García J, Sosa I. The Nasal Route as a Potential Pathway for Delivery of Erythropoietin in the Treatment of Acute Ischemic Stroke in humans. *Sci. World J*. 2009; 9: p. 970-981.
138. Nuñez Y, Bueno P, Carrillo D, Jiménez N, Valdés O, al e. Neuroprotective effect of a nasal formulation of erythropoietin with low sialic acid content. *Rev. Cubana Farm*. 2009; 43(1): p. 1-13.
139. Rodríguez Y, Muñoz A, Subirós N, Mengana Y, Sosa I, al e. Treatment with Nasal NeuroEPO Improves the neurological, cognitive, and histological state in a gerbil model of focal ischemia. *Sci. World J*. 2010; 10: p. 2288-2300.
140. Weber A, Maier R, Hoffmann U, Grips M, Hoppenz M, Aktas A, et al. Erythropoietin improves synaptic transmission during and following ischemia in rat hippocampal slice cultures. *Brain Res*. 2002; 958(2): p. 305-311.
141. Parra AL, Rodríguez JCG. Nasal Neuro EPO Could be a Reliable Choice for Neuroprotective Stroke Treatment. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry*. 2012; 12: p. 60-68.
142. Locatelli F, Vecchio L. Optimizing the management of renal anemia: challenges and new opportunities. *Kidney International*. 2008; 74(111): p. S33–S37.
143. Dalle B, Henri A, Rouyer-Fessard P, Bettan M, Scherman D, Beuzard Y, et al. Dimeric erythropoietin fusion protein with enhanced erythropoietic activity in vitro and in vivo. *Blood*. 2001; 97: p. 3776–3782.
144. Mikhail A, Covic A, Goldsmith D. Stimulating Erythropoiesis: Future Perspectives. *Kidney Blood Press Res*. 2008; 31: p. 234–246.
145. Coscarella A, Liddi R, Bach S, Zappitelli S, Urso R, Mele A, et al. Pharmacokinetic and immunogenic behavior of three recombinant human GM-CSF-EPO hybrid proteins in cynomolgus monkeys. *Mol Biotechnol*. 1998; 10(2): p. 115-22.
146. Coscarella A, Liddi R, Bach S, Faiella A, Mele A, al e. The rhGM-CSF-EPO hybrid protein MEN 11300 induces anti-EPO antibodies and severe anaemia in rhesus monkeys. *Cytokine*. 1998; 10: p. 964–969.
147. Way J, Lauder S, Brunkhorst B, Kong S, Qi A, al e. Improvement of Fc-erythropoietin structure and pharmacokinetics by modification at a disulfide bond. *Protein Eng Des Sel*. 2005; 18(3): p. 111-8.
148. Borges L. Different modalities of erythropoiesis stimulating agents. *Port J Nephrol*

- Hypert. 2010; 24(2): p. 137-145.
149. Macdougall I. Novel Erythropoiesis-Stimulating Agents: A New Era in Anemia Management. Clin J Am Soc Nephrol. 2008; 3: p. 200–207.
 150. Dumont J, Bitonti A, Clark D, Evans S, Pickford M, Newman S. Delivery of an erythropoietin-Fc fusion protein by inhalation in humans through an immunoglobulin transport pathway. J Aerosol Med. 2005; 18: p. 294–303.
 151. Shi X, Yang J, Zhu H, Ye L, Feng M, al e. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Recombinant Human EPO-Fc Fusion Protein In Vivo. Plos One. ; 8(8).
 152. Bugelski P, Nesspor B, Spinka-Doms T, Markopoulos D, Eirikis E, al e. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of CTNO528, a novel erythropoiesis receptor agonist in normal and anemic rats. Blood. 2005; 106: p. 146b.
 153. Bouman-Thio E, Franson K, Miller B, Getsy J, Cohen A, al e. A phase I, single and fractionated, ascending-dose study evaluating the safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and immunogenicity of an erythropoietin mimetic antibody fusion protein (CNTO 528) in healthy male subjects. J Clin Pharmacol. 2008; 48(10): p. 1197-207.
 154. Franson K, Bouman-Trio E, Cohen A, Miller B, Jang H, al e. A phase I, single and fractionated, ascending dose study evaluating the safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and immunogenicity of an erythropoietic mimetic antibody fusion protein, CTNO528 in healthy male subjects. Blood. 2005; 106: p. 146b.
 155. Sathyanarayana P, Houde E, Marshall D, Volk A, Makropoulos D, al e. CNTO 530 functions as a potent EPO mimetic via unique sustained effects on bone marrow proerythroblast pools. Blood. 2009; 113(20): p. 4955–4962.
 156. Kliwinski C, Makropoulos D, Kwok D, Volk A, Foster K, al e. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of an EPO-Mimetic Fusion Protein in a Model of Chronic Renal Insufficiency Anemia. Open Hematology Journal. 2010; 4: p. 17-20.
 157. Achuthanandam R, Makropoulos D, Johns L, Volk A, Brosnan K, al e. Pharmacodynamics of CNTO 530 and Darbepoetin- α in Human TNF- α Transgenic Mice, a Murine Model of Anemia of Chronic Disease. Pharmacology & Pharmacy. 2011; 2: p. 17-30.
 158. Elliott S. Erythropoiesis-stimulating agents and other methods to enhance oxygen transport. British Journal of Pharmacology. 2008; 154: p. 529–541.
 159. Astellas. Adverse event of FG-2216 for the treatment of anemia. News release. 2007.

160. Astellas , Fibrogen. FibroGen and Astellas Announce Initiation of Phase 3 Trial of FG-4592/ASP1517 for Treatment of Anemia of Chronic Kidney Disease. 2012.
161. Provenzano R, Goodkin D, Klaus ~, Linde P, Kazazi F, Lee T, et al. Evaluation of FG-4592, a Novel Oral Hypoxia-Inducible Factor Prolyl Hydroxylase Inhibitor, to Treat Anemia in Hemodialysis Patients. *American Journal of Kidney Diseases*. 2011; 57(4): p. B80.
162. Flight M. AstraZeneca bets on FibroGen's anaemia drug. *Nature*. 2013; 12: p. 730.
163. Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, Mativet S, Grandchamp B, Beaumont C, et al. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(7): p. 4596-4601.
164. Roy C, Mak H, Akpan I, Losyev G, Zurakowski D, al e. Hepcidin antimicrobial peptide transgenic mice exhibit features of the anemia of inflammation. *Blood*. 2007; 109(9): p. 4038-44.
165. Sengoelge G, Sunder-Plassmann G, Horl H. Potential risk for infection and atherosclerosis due to iron therapy. *J Renal Nutr*. 2005; 15(1): p. 105-110.
166. Larson D, Coyne D. Understanding and exploiting hepcidin as an indicator of anemia. *Kidney Res Clin Pract*. 2013; 32: p. 11-15.
167. Poli M, Girelli D, Campostrini N, Maccarinelli F, Finazzi D, al e. Heparin: a potent inhibitor of hepcidin expression in vitro and in vivo. *Blood*. 2011; 117(3): p. 997-1004.
168. Li J, Vlodavsky I. Heparin, heparan sulfate and heparanase in inflammatory reactions. *Thromb Haemost*. 2009; 102: p. 823–828.
169. Poli M, Girelli D, Naggi A, Campostrini N, Asperti M, al e. Identification of heparins without anticoagulant activity which inhibit hepcidin in vivo. *Am J Hematol*. 2013; 5(88): p. E40.
170. Poli M, Asperti M, Naggi A, Campostrini N, Girelli D, al e. Glycol-split non-anticoagulant heparins are inhibitors of hepcidin expression in vitro and in vivo. *Blood*. 2014.
171. Wang L, Harrington L, Trebicka E, Shi H, al e. Selective modulation of TLR4-activated inflammatory responses by altered iron homeostasis in mice. *J Clin Invest*. 2009; 119(11): p. 3322–3328.
172. Steinbicker A, Sachidanandan C, Vonner A. Inhibition of bone morphogenetic protein signaling attenuates anemia associated with inflammation. *Blood*. 2011; 117: p. 4915–4923.

173. Theur I, Schroll A, Sonnweber T, Nairz M, Theurl M, al e. Pharmacologic inhibition of hepcidin expression reverses anemia of chronic inflammation in rats. *Blood*. 2011; 118: p. 4977-4984.
174. Vogta J, Traynorb R, Sapkotaa G. The specificities of small molecule inhibitors of the TGF β and BMP pathways. *Cellular Signalling*. 2011; 23(11): p. 1831–1842.
175. Hashizume M, Uchiyama Y, Horai N, Tomosugi N, Mihara M. Tocilizumab, a humanized anti-interleukin-6 receptor antibody, improved anemia in monkey arthritis by suppressing IL-6-induced hepcidin production. *Rheumatol Int*. 2010; 30(7): p. 917-23.
176. Song S, Tomosugi N, Kawabata H. Down-regulation of hepcidin resulting from long-term treatment with an anti-IL-6 receptor antibody (tocilizumab) improves anemia of inflammation in multicentric Castleman disease. *Blood*. 2010; 116: p. 3627–3634.
177. Edwards C. IL-6 inhibition and infection: treating patients with tocilizumab. *Rheumatology*. 2012; 51: p. 769-770.
178. Sasu B, Cooke K, Arvedson T, Ellison A, Sheng J, Winters A, et al. Antihepcidin antibody treatment modulates iron metabolism and is effective in a mouse model of inflammation-induced anemia. *Blood*. 2010; 115: p. 3616-3624.
179. Skerra A. Alternative binding proteins: anticalins - harnessing the structural plasticity of the lipocalin ligand pocket to engineer novel binding activities. *FEBS J*. 2008; 275(11): p. 2677-83.
180. Hohlbaum A, Gille H, Christian J, Allersdorfer A, Jaworski J, al e. Iron mobilization and pharmacodynamic marker measurements in non-human primates following administration of PRS-080, a novel and highly specific anti-hepcidin therapeutic. *Am J Hematol*. 2013; 5(88): p. E41.
181. Sun C, Vaja V, Babitt J, Lin H. Targeting the hepcidin–ferroportin axis to develop new treatment strategies for anemia of chronic disease and anemia of inflammation. *American Journal of Hematology*. 2012; 87: p. 392–400.
182. Pendergrast P, Marsh H, Grate D, Healy J, Stanton M. Nucleic Acid Aptamers for Target Validation and Therapeutic Applications. *Journal of Biomolecular Techniques*. 2005; 16: p. 224–234.
183. Schwoebel F, van Eijk L, Zboralski D, Sell S, Buchner K, Maasch C, et al. The effects of the anti-hepcidin Spiegelmer NOX-H94 on inflammation-induced anemia in cynomolgus monkeys. *Blood*. 2013; 121(12): p. 2311-5.
184. Riecke K, Zollner S, Boyce M, van Hecke B, Vauleon S, Summo L, et al. Single and repeated dose first-in-human study with the anti-hepcidin spiegelmer NOX-

- H94. *Am J Hematol*. 2013; 5(88): p. E42.
185. Bouchard P, Hutabarat R, Thompson K. Discovery and development of therapeutic aptamers. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2010; 50: p. 237-57.
186. Coyne D. Heparin: clinical utility as a diagnostic tool and. *Kidney International*. 2011; 80: p. 240–244.
187. Ingley E, Tilbrook P, Klinken S. New insights into the regulation of erythroid cells. *IUBMB Life*. 2004; 56(4): p. 177-84.
188. Imagawa S, Nakano Y, Obara N, Suzuki N, Doi T, et al. A GATA-specific inhibitor (K-7174) rescues anemia induced by IL-1 β , TNF- α , or L-NMMA. *FASEB J*. 2003; 17(12): p. 1742-4.
189. Nakano Y, Imagawa S, Matsumoto K, Stockmann C, Obara N, et al. Oral administration of K-11706 inhibits GATA binding activity, enhances hypoxia-inducible factor 1 binding activity, and restores indicators in an in vivo mouse model of anemia of chronic disease. *blood*. 2004; 104: p. 4300-4307.
190. Valliant A, Hofmann R. Managing dialysis patients who develop anemia caused by chronic kidney disease: focus on peginesatide. *International Journal of Nanomedicine*. 2013; 8: p. 3297–3307.
191. Lippin Y, Dranitzki-Elhalel M, Brill-Almon E, Mei-Zahav C, Mizrahi S, et al. Human erythropoietin gene therapy for patients with chronic renal failure. *Blood*. 2005; 106(7): p. 2280-2286.
192. Lippin Y, Dranitzki-Elhalel M, Brill-Almon E, Mei-Zahav C, Mizrahi S, et al. Human erythropoietin gene therapy for patients with chronic renal failure. *Blood*. 2005; 106: p. 2280-2286.
193. Mitrani E, Pearlman A, Stern B, Miari R, Goltsman H, Kunicher N, et al. Biopump: Autologous skin-derived micro-organ genetically engineered to provide sustained continuous secretion of therapeutic proteins. *Dermatologic Therapy*. 2011; 24: p. 489–497.
194. Medgenics. Medgenics Announces Positive Data from Phase I/II Clinical Trial of EPODURE Treatment of Anemia in Chronic Kidney Disease. Business wire. 2009.
195. Cho S. Novel Therapy for CKD Anemia Advances. *Renal and Urology News*. 2011.
196. Medgenics. First Subjects Enrolled in Phase IIa Clinical Trial of EPODURE Biopumps to Treat Anemia in Patients with End-Stage Renal Disease on Dialysis. Business Wire. 2012.

197. Medgenics. Medgenics Reports Positive Interim Results from Ongoing Phase IIa Study of EPODURE to Treat Anemia in Dialysis Patients. Business wire. 2013.
198. Nienhuis A. Development of gene therapy for blood disorders: an update. *Blood*. 2013; 122: p. 1556-1564.
199. Seliger S, Zhang A, Weir M, et al. Erythropoiesis-stimulating agents increase the risk of acute stroke in patients with chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2011; 80: p. 288–294.